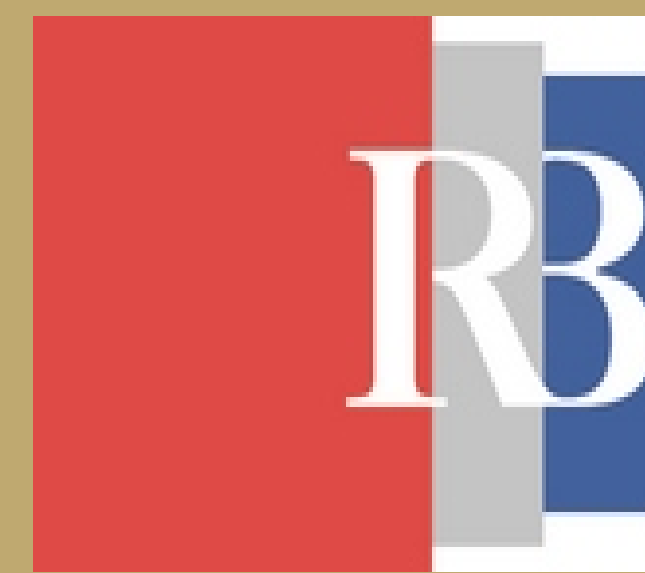


DRVO ŽIVOTA

Dictyostelium discoideum: organizam na granici jednostaničnog i višestaničnog oblika života

Vlatka Antolović i Maja Marinović

Zavod za molekularnu biologiju / Laboratorij za elektronsku mikroskopiju



Uvod

Ameboidni protist *Dictyostelium discoideum* predstavlja izvrstan modelni organizam za izučavanje stanične diobe, staničnog gibanja, kemotaksije, fagocitoze, prijenosa signala i stanične diferencijacije. Osim jednostavnog uzgoja u laboratorijskim uvjetima i velikog broja razvijenih molekularno-genetičkih metoda, značajno je i da veliki dio "diktijeovog" genoma veličine 34 Mb sadrži gene homologne onima u višim eukariotima.



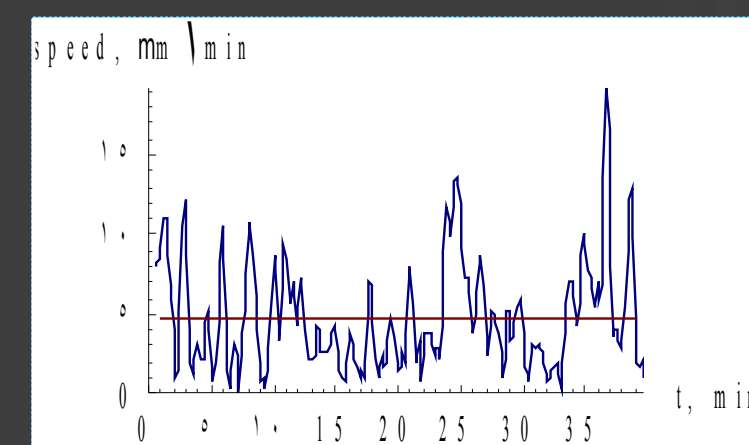
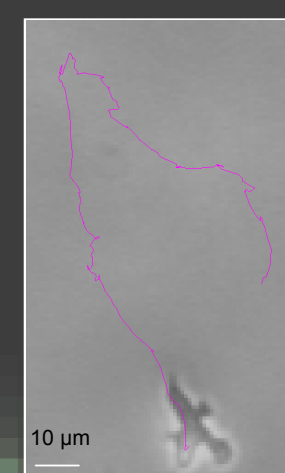
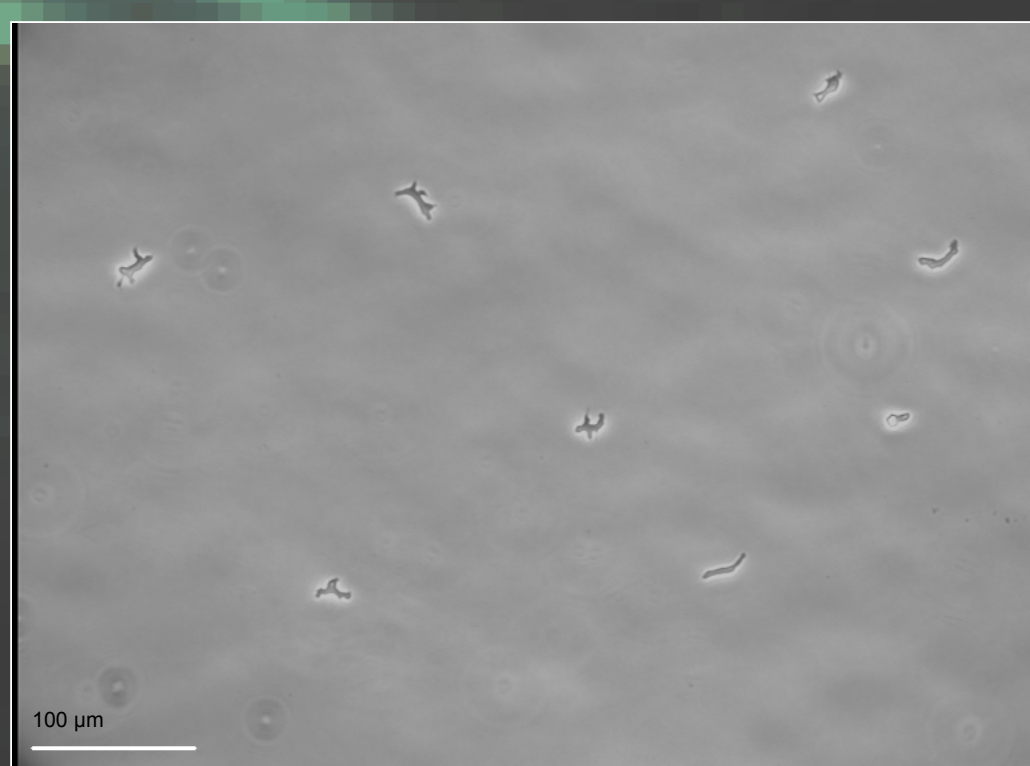
Rex Chisholm, Northwestern University
Featured in The New Genetics

Prirodno stanište ovog protista je šumsko tlo na kojem, uz dovoljno hrane, živi kao jednostanična ameba. U nepovoljnim uvjetima, poput gladovanja ili suše, ove stanice se združuju u pokretljivu višestaničnu strukturu koja sadrži oko 100 000 stanica sa jasnom podjelom funkcija – manji dio stanica će s vremenom postati stalak, dok će se njih 80% diferencirati u spore.

Modeliranje staničnog gibanja

Stanična pokretljivost ima presudnu ulogu u mnogim fiziološkim i patološkim procesima, poput embriogeneze, neurogeneze, imunološkog odgovora, zacjeljivanja rana i metastaziranja tumorskih stanica. Mnogi od tih procesa vođeni su sposobnošću stanica da detektiraju i reagiraju na gradijent određenih aktivnih supstanci. Međutim, u svrhu istraživanja osnovnih principa polarnosti i pokretljivosti stanica, gibanje stanica se često proučava i u izotropnom okolišu. Neutrofili "lutaju" po stijenkama krvnih žila dok ne detektiraju signal koji ih zatim usmjerava prema stranom tijelu. Ameboidne stanice *Dictyostelium* također "lutaju" dok ne detektiraju ciklički AMP koji usmjerava stanicu prema centrima agregacije iz kojih kasnije nastaje višestanična struktura. Proučavanje tog "nasumičnog" gibanja i pravilnosti koje se očituju na makroskopskoj skali može dati informacije o temeljnim molekularnim mehanizmima koji upravljaju staničnim gibanjem, kao što su polimerizacija aktinski niti, mehanizmi kontrole ekstenzije pseudopodija, interakcija stanice sa podlogom i mnogi drugi.

Gibanje stanica pratimo uglavnom pomoću mikroskopije faznog kontrasta. Numeričke podatke dobivene analizom filmova dalje obrađujemo različitim programskim paketima kako bi dobili podatke o trenutnoj brzini, detektirali pravilnosti u kretanju i, naposljetku, predložili model gibanja stanica.



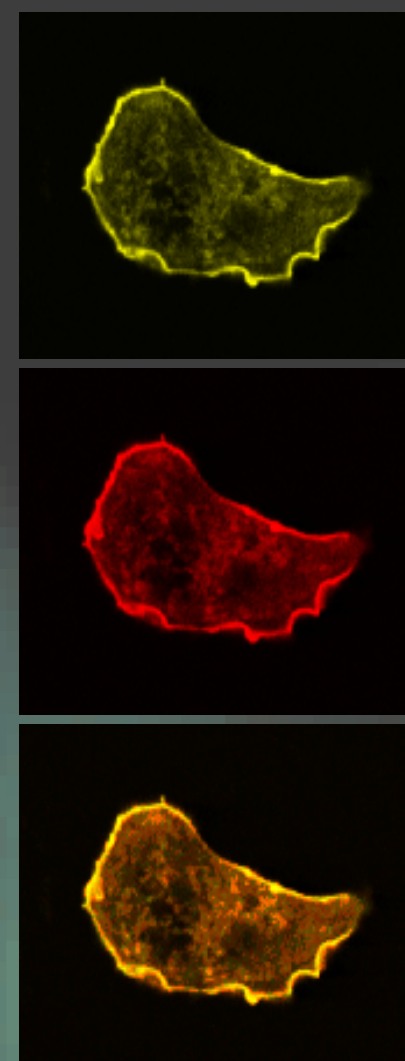
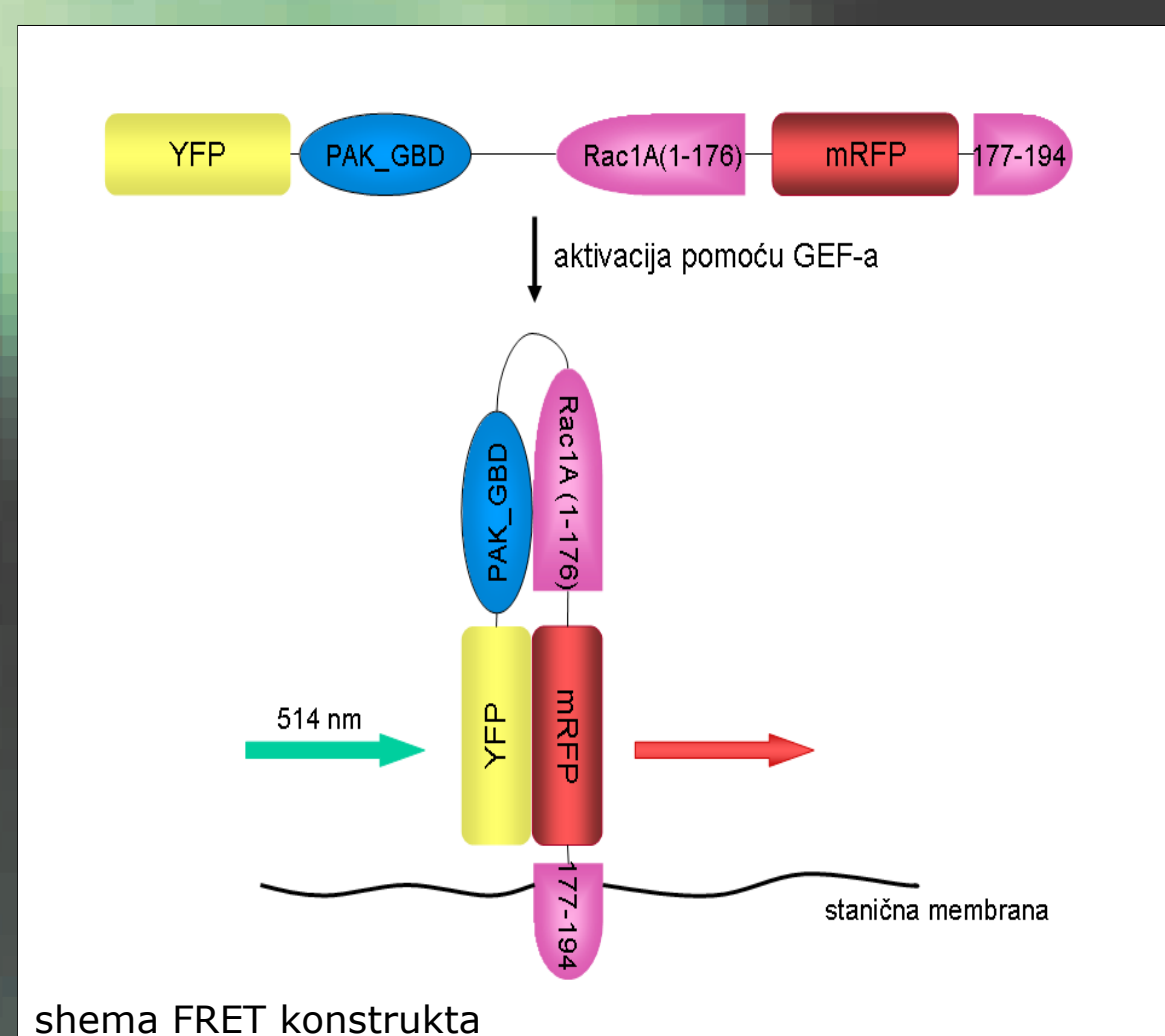
$$\frac{d\vec{v}(t)}{dt} = -\beta(v(t))\vec{v}(t) - \alpha^2 \int_{-\infty}^t e^{-\gamma(t-\tau)} \vec{v}(\tau) d\tau + \sigma(v(t))\vec{\eta}(t)$$

(Takagi et al., 2008)

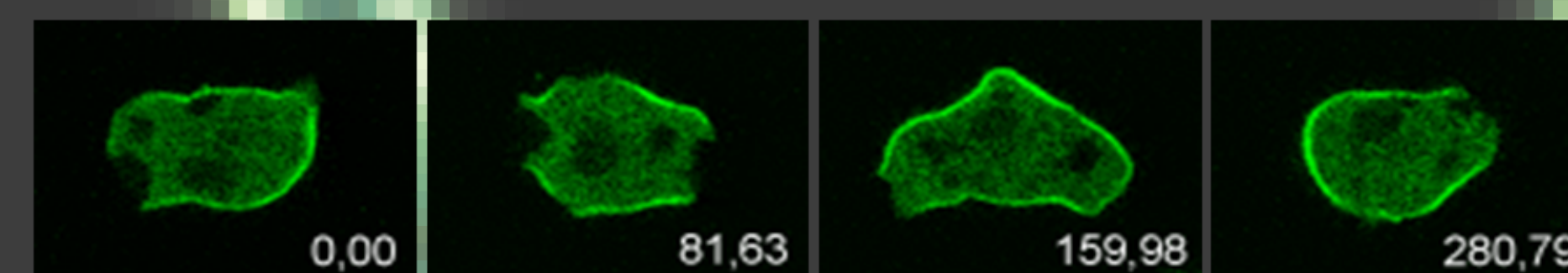
Istraživanje regulacije staničnog gibanja

Uz proučavanje gibanja na razini čitave stanice, istražujemo i dinamiku aktinskog citoskeleta, supramolekularnog sustava koji to gibanje omogućuje. Konkretnije, istražujemo proteine koji interagiraju s Rho GTP-azama, malim proteinima koji osim u regulaciji staničnog kretanja sudjeluju i u širokom spektru drugih staničnih procesa, poput regulacije polarnosti stanice, endocitoze i citokineze. Posebno je zanimljiva činjenica da se upotrebom konfokalne mikroskopije i proteina ili domena obilježenih florescentnim proteinima (GFP, YFP, mRFP) različiti stanični procesi mogu pratiti u realnom vremenu.

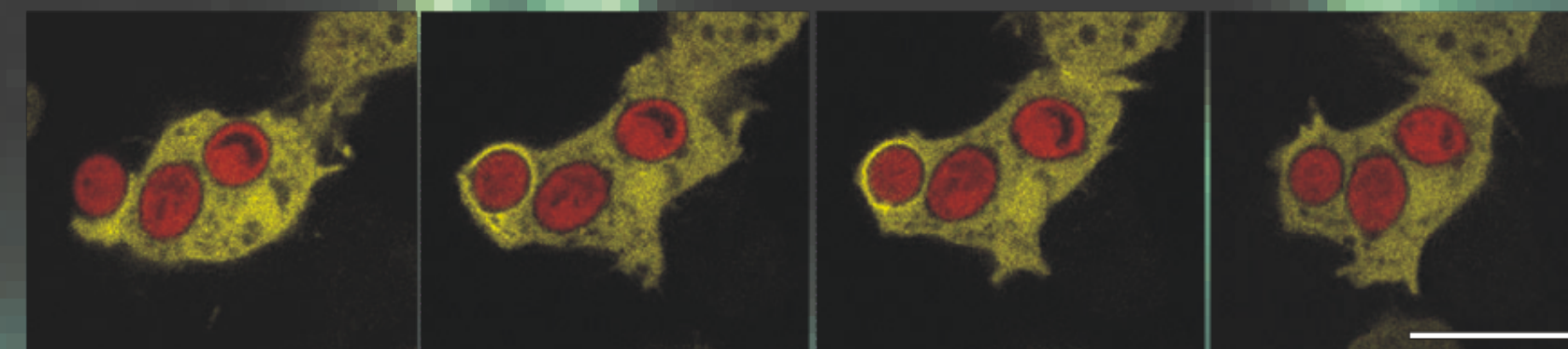
Različitost procesa u koje su Rho GTP-aze uključene ukazuje na široki spektar ciljnih nizvodnih molekula, pa je zbog toga prvo potrebno identificirati proteine i/ili proteinske domene koji stupaju u interakciju s pojedinom GTP-azom. Te interakcije određujemo *in vitro* pomoću sustava dvaju hibrida u kvascu (Y2H) te afinitetnom kromatografijom i imunoprecipitacijom specifičnim antitijelima (pull-down). Za detekciju *in vivo* koristimo FRET metodu (rezonantni prijenos energije fluorescencije).



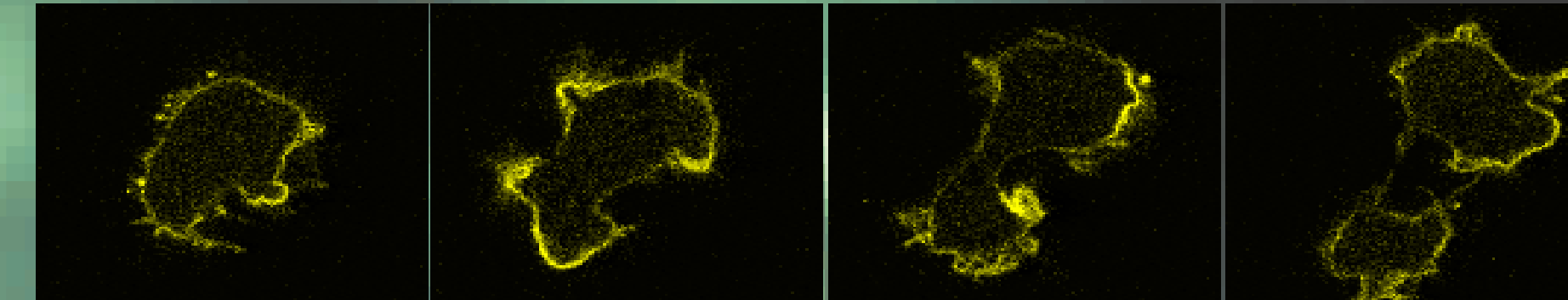
Gibanje stanica:



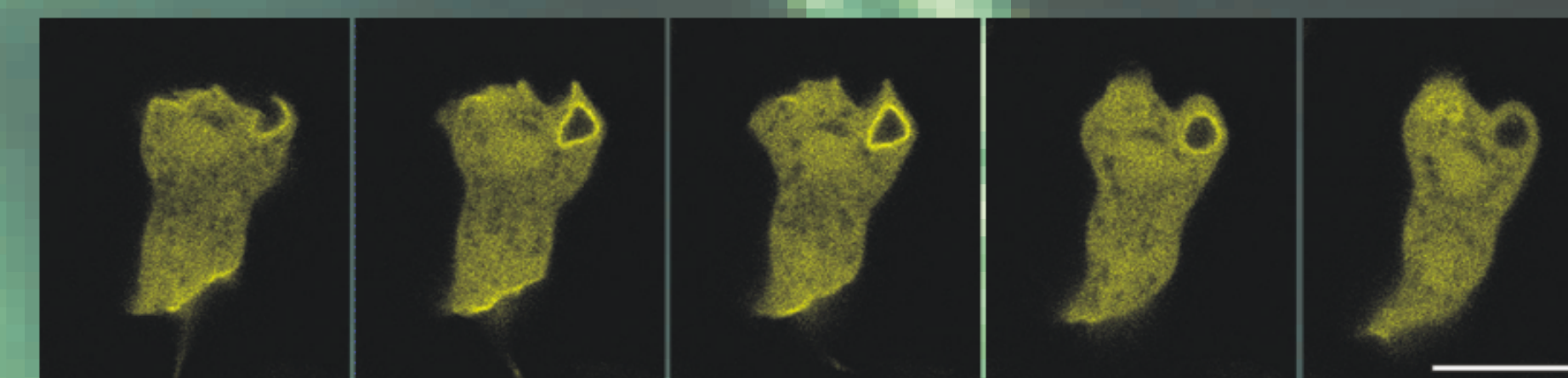
Fagocitoza:



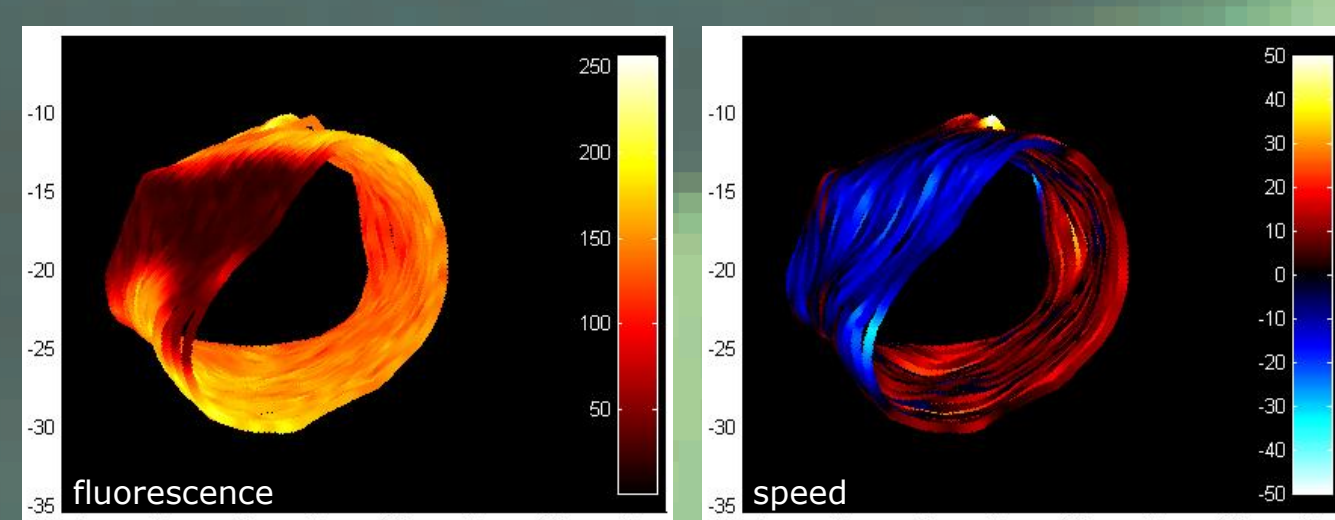
Citokineza:



Pinocitoza:



Upotrebom različitih programskih paketa za analizu slike, može se povezati lokacija pojedinih proteina u membrani s dinamikom membrane.



Projekti:

- Regulacija dinamike citoskeleta u kretanju i diobi stanica (MZOŠ)
- Biophotonics approach to regulation of the actin cytoskeleton dynamics by small GTPase proteins (UKF)

Voditelj projekata i suradnici: dr.sc. Igor Weber(voditelj), dr.sc. Vedrana Filić Mileta